



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do
gene HSP70 em populações de *Litopenaeus vannamei*
comercializadas no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do título de Mestre em
Aquicultura.

Orientadora: Luciane Maria Perazzolo
Coorientador: Rodolfo Luis Petersen

AUGUSTO LUIZ FERREIRA JUNIOR

Florianópolis/SC
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira Junior, Augusto Luiz Ferreira Junior

Análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs)
do gene HSP70 em populações de *Litopenaeus vannamei*
comercializadas no Brasil / Augusto Luiz Ferreira Junior
Ferreira Junior ; orientadora, Luciane Maria Perazzolo
Perazzolo ; coorientador, Rodolfo Luis Petersen Petersen. -
Florianópolis, SC, 2014.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. diversidade genética. 3. WSSV. 4.
IMNV. I. Perazzolo, Luciane Maria Perazzolo. II.
Petersen, Rodolfo Luis Petersen. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
IV. Título.

**Análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do gene
HSP70 em populações de *Litopenaeus vannamei* comercializadas no
Brasil**

Por

AUGUSTO LUIZ FERREIRA JUNIOR

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dra. Luciane Maria Perazzolo – *Orientadora*

Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa

Dr. Rodrigo Maggioni

Dedico a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família por todo o apoio que me deram nestes anos de estudo. Obrigado senhor Augusto, Dona Lourdes e as duas mulheres mais lindas que conheço Isvânia e Ivanessa. Aos meus dois cunhados, Darci e Fabio, pela paciência e acolhida durante o primeiro ano de mestrado. E a mais nova integrante da nossa família, a minha sobrinha linda e abençoada Helena, dona de um sorriso lindo!

À minha orientadora professora Dra. Luciane Maria Perazzolo pela paciência e possibilidades acadêmicas nestes dois anos.

Ao meu Co-orientador professor Dr. Rodolfo Luis Petersen pela paciência, compreensão possibilidades acadêmicas nestes dois anos de laboratório.

Ao professor Dr. Rodrigo Maggioni pela paciência, apoio, esclarecimento de dúvidas e acolhimento super prestativo durante as minhas passagens pelo CEDECAM-UFC.

À técnica do Laboratório do GECEMAR, Daniele Conceição pelo apoio e incentivo para esclarecer dúvidas e me estimular a aprofundar os estudos associados à Biologia Moleculares.

Ao técnico João Mafaldo pelo apoio e acolhimento em sua casa durante as minhas passagens pelo CEDECAM-UFC.

A Cristhiane Guertler, Emily Justino e Michael Jaramillo pela execução do desafio viral com WSSV.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura-UFSC, GECEMAR-UFPR e CEDECAM-UFC pelas parcerias e aprendizado de convivência no mesmo ambiente de trabalho.

Aos órgãos de fomento Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FINEP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Obrigado aos meus Amigos Marco, Bot, Thaise, Ruth, Maicon, Maria, Caio, Bianca e Theresinha pelo apoio e por me aguentarem durante estes anos.

Obrigado aos laboratórios ou centros de pesquisa pelos estágios oferecidos e o conhecimento transmitido.

Obrigado a todos os professores e pesquisadores que ministram disciplinas, mini-cursos, cursos e palestras que tive a possibilidade de assistir nestes dois anos de mestrado.

Agradeço a minha companheira e sua filha pelo apoio e paciência que tiveram durante estes dois anos de estudos.

“MUDE, mas comece devagar,
por que a direção é MAIS
importante que a velocidade.”

Clarice Lispector.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar a diversidade genética do gene HSP70 através da análise de SNPs em três populações (LV A, LV B e LV C) de *Litopenaeus vannamei* comercializadas no Brasil e verificar se existe associação entre seus genótipos e a tolerância ao vírus da síndrome da mancha branca. (WSSV). Um desafio viral foi efetuado com a população LV B (nunca exposta à doença viral). O fragmento (posição 475 a 1594) do gene HSP70 foi amplificado em PCR com os iniciadores específicos. Neste estudo utilizou-se 5 SNPs (C661A, T712C, C782T, C892T e C1090T) presentes nas três populações. As heterozigozidades (H_o e H_e) foram menores nas populações LV A e LV B (sem controle de pedigree) comparadas com LV C (com melhoramento genético de resistência a vírus). O F_{IS} indicou que as populações LV A e LV B possuem maiores coeficientes endogamia (4,5 e 5,0 x maiores, respectivamente) comparadas com a população LV C. Houve uma baixa divergência gênica (F_{ST} : 0,042; G_{ST} : 0,031) e diferenças entre as populações ($p < 0,05$). Uma baixa distância genética ($NeiD$) foi observada entre as populações, com diferença fenotípicas ($p < 0,05$) no SNP C892T entre as populações sem controle de pedigree (LVA e LV B) e a população com melhoramento genético de resistência viral (LV C). No desafio viral não se observou diferenças entre os genótipos e a tolerância ao WSSV, mas com um aumento da frequência no alelo T do SNP C892T. Podemos concluir que existem pequenas diferenças entre as três populações cultivadas no Brasil e uma possível relação do SNPs C892T a doenças virais.

Palavras-chave: WSSV, IMNV, marcadores moleculares, chaperonas, diversidade genética.

ABSTRACT

This work was aimed at studying the genetic diversity of HSP70 gene by analyzing SNPs in three *Litopenaeus vannamei* populations (LV A, LV B and LV C) marketed in Brazil and investigating whether its genotypes are somehow associated to tolerance to the white spot syndrome virus (WSSV). A viral challenge was carried out with the LV B population (never subjected to the viral disease). A fragment (position 475 to 1594) of the HSP70 gene was PCR amplified with specific primers. In this study we used 5 SNPs (C661A, T712C, C782T, C892T and C1090T) present in three populations. Heterozygosities (H_o and H_e) were lower in the populations LV A and LV B (no pedigree control) when compared with LV C (with breeding for virus resistance). F_{IS} has revealed that the populations LV A and LV B have higher inbreeding coefficients (4.5 and 5.0 x higher, respectively) when compared with LV C. There have been low genetic divergence (F_{ST} : 0.042; G_{ST} : 0.031) and differences between populations ($p < 0.05$). Low genetic distance ($NeiD$) was observed amongst populations and there were phenotypic differences ($p < 0.05$) in the SNP C892T of populations without pedigree control (LVA and LV B) and that subjected to breeding for viral resistance (LV C). In viral challenge there were no differences between the genotypes and tolerance to WSSV, but the T allele frequency was seen to have increased in SNP C892T. We can therefore conclude that there are small differences between the three populations grown in Brazil, as well as a possible association of C892T SNPs with viral diseases.

Keywords: WSSV, IMNV, molecular markers, chaperones, genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura genômica e distribuição de SNPs no gene HSP70 de *L. vannamei*. Linha cinza claro representa o fragmento do gene; setas indicam o início e fim do fragmento e da expressão da proteína HSP70; aminoácidos contendo os SNPs foram representados em diferente fonte..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das três populações cultivadas de <i>L. vannamei</i> utilizadas nesse estudo.	40
Tabela 2. Haplótipos dos SNPs dos fragmentos dos exons do gene HSP70 das populações cultivadas de <i>L. vannamei</i> no Brasil. * fragmento da sequência do gene HSP70 de <i>L. vannamei</i> (Genbank: AY645906); LVA – população LAGUNA (Sul); LVB – população HH (Sul); LVC – população SPR (Nordeste); 1 a 19 – genótipos.	43
Tabela 3. Diversidade genética das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR) de <i>Litopenaeus vannamei</i> comercializadas no Brasil. Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de endogamia (F_{IS}), equilíbrio de Hardy–Weiberg (EHW) e número de indivíduos (N). DP- desvio padrão; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$	44
Tabela 4. Distribuição da frequência alélica dos <i>locus</i> do gene HSP70 e teste de X^2 par a par das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; número de indivíduos (N).	45
Tabela 5. Índices de fixação populacional (G_{ST} e F_{ST}) e distância genética ($NeiD$) analisadas par a par das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$	45
Tabela 6. Resultados do teste de desafio da população LV B (HH) frente ao WSSV. Frequência alélica (F. A.), frequência genotípica (F. G.), número de indivíduos (N) e análise do teste de X^2 para cada <i>locus</i> do gene HSP70.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
BP - baculovírus penaei
CHH – hormônio hiperglicêmico de crustáceos
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfatados
EHW – equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
F. A. – frequência alélica
F. G. – frequência genotípica
F_{IS} – índice de endogamia
F_{ST} – grau de divergência *genética* entre as populações
G_{ST} – grau de divergência *genética* entre as populações
He – herezogenicidade esperada
Ho – herezogenicidade observada
HH – população de alta sanidade
HPV - parvovírus da hepatopancreatite
HSC70 – proteína cognitiva de choque 70kDa
HSP70 – proteína de choque térmico 70 kDa
HSC – proteína cognitiva de choque
HSP – proteína de choque térmico
IHHNV – vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética
IHHN - infecção hipodermal e necrose hematopoiética
IMNV – vírus da mionecrose infecciosa
IMN – mionecrose infecciosa
LV A – população LAGUNA (região Sul do Brasil – Santa Catarina)
LV B – população HH (região Sul do Brasil– Santa Catarina)
LV C – população SPR (região Nordeste do Brasil – Rio Grande do Norte)
MBV - baculovirus de *Penaeus monodon*
MIH –hormônio “*molt-inhibiting*”
mRNA –ácido ribonucleico mensageiro
NeiD – distância genética (Nei, 1977)
NHP - hepatopancreatite necrosante
OIE – Organização Internacional de Epizootias
PCR – Reação em cadeia da polimerase
QTL – *loci* de caracteres quantitativos
RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso
RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento obtidos por cortes em DNA de dupla fita

RNAi – RNA de interferência
SNPs – polimorfismos de nucleotídeo único
SPF – população livre de patógenos específicos
SPR – população resistente a patógenos específicos
SSR – sequências simples repetidas
STAT – transdutores do sinal e ativadores da transcrição
TS – Síndrome Taura
TSV – vírus da síndrome de Taura
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
WSS – síndrome da mancha branca
WSSV – vírus da síndrome da mancha branca
YHV - vírus da cabeça amarela
X² – qui-quadrado
5HT1R – receptor 1 da 5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REGIÕES BRASILEIRAS PRODUTORAS DE CAMARÃO	24
PRINCIPAIS POPULAÇÕES DE <i>L. vannamei</i> CULTIVADAS NO BRASIL.....	25
ENFERMIDADES E MECANISMOS DE DEFESA ANTI-VIRAIS EM CAMARÕES.....	26
HEAT SHOCK PROTEINS 70 (HSP70).....	28
ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	29
Heterozigotidade média observada ($\overline{H_o}$).....	30
Heterozigotidade média esperada ($\overline{H_e}$).....	30
Frequências alélicas (F. A.)	30
Frequências genotípicas (F.G.)	31
Análises F	31
MELHORAMENTO GENÉTICO E MARCADORES MOLECULARES	32
POLIMORFISMOS DE NÚCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)	33
Artigo científico	
Título	37
Autores	37
Resumo.....	37
1. INTRODUÇÃO	38

2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. <i>Animais e Origem do material genético</i>	40
2.2. <i>Desafio viral</i>	40
2.3. <i>Extração de DNA genômico e Amplificação do gene HSP70.</i> ..	41
2.4 <i>Genotipagem dos SNPs</i>	41
2.5 <i>Análise dos dados</i>	42
3. RESULTADOS.....	42
3.1. <i>Diversidade genética</i>	42
3.2. <i>Desafio Viral</i>	46
4. DISCUSSÃO	46
5. AGRADECIMENTOS	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	56

INTRODUÇÃO

A produção pesqueira e aquícola mundial contabilizaram, em 2012, cerca de 177,03 milhões de toneladas de pescado (FAO, 2014). Esta acentuada produção de pescado representa uma valiosa fonte proteica mundial, visto que em 2009 o pescado representou 16,6 % do aporte de proteína animal e 6,5 % de toda a proteína consumida pelas populações ao redor do mundo. Esse aumento se deve principalmente à aquicultura, uma vez que esta atividade tem crescido rapidamente nas últimas três décadas, chegando a 79 milhões de toneladas de produção (animais comestíveis e não comestíveis) com valor agregado de 125 milhões de dólares (FAO, 2012). Atualmente a aquicultura emprega 100 milhões de pessoas direta ou indiretamente associadas a sua cadeia produtiva (FAO, 2012), cultivando cerca de 600 espécies aquáticas em todo o mundo em diversos sistemas e instalações em águas doces, salobras e marinhas (FAO, 2014).

Em 2012, a aquicultura mundial produziu 90,43 milhões de toneladas de espécies aquáticas, sendo os grupos cultivados: os peixes (66,3 %, 44,15 milhões de toneladas); moluscos (22,8 %, 15,17 milhões de toneladas); crustáceos (9,7 %, 6,45 milhões de toneladas); outros animais aquáticos (1,3 %, 865 mil de toneladas) (FAO, 2014). Os países asiáticos são responsáveis por 89% da produção aquícola mundial, sendo os maiores produtores a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia. Em seguida, destaca-se o continente americano (com 4,78% da produção aquícola mundial), sendo os maiores produtores o Chile, Brasil, EUA e Equador (FAO, 2014).

Apesar dessa alta demanda comercial, as enfermidades representam um dos fatores que mais influenciam no decréscimo produtivo da aquicultura a nível mundial. Esta influência negativa para a produção aquícola pode ser notada em vários casos, como na produção de salmão no Chile, de ostras na Europa e de camarão marinho na Ásia, América do Sul e África, decorrentes especialmente de enfermidades virais e/ou bacterianas (FAO, 2012; STENTIFORD et al., 2012).

Os crustáceos representam o terceiro grupo mais cultivado no mundo, sendo que a carcinicultura abarcou, em 2012, o cultivo de cerca de 39% de espécies dulcícolas e 61% de espécies marinhas (FAO, 2014), sendo a espécie predominante o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Esta espécie é responsável por 71,8% da produção mundial de camarões cultivados em águas marinhas, salobras e doces em todo o mundo (FAO, 2012).

REGIÕES BRASILEIRAS PRODUTORAS DE CAMARÃO

A região Nordeste é a principal produtora de camarões marinhos sendo responsável por mais de 90% da produção nacional, com os Estados do Ceará e Rio Grande do Norte na liderança, seguido pela Bahia (BORBA, 2014).

Na região Sul, o estado de Santa Catarina se destaca como sendo o maior produtor aquícola, especialmente de moluscos bivalves (Epagri, 2013). Nos últimos anos, o estado sofreu grande queda na carcinicultura devido a mortalidades causadas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White spot syndrome virus*), surgidos em cultivos de Imaruí (SC), no final de 2004 (OIE, 2005). A influência mútua da intensificação da produção e as condições climáticas do sul do Brasil ocasionaram uma maior susceptibilidade dos animais ao WSSV, impactou drasticamente o cultivo de *L. vannamei* no estado catarinense, sendo que apenas 200 dos 1.600 hectares de viveiros em produção não foram afetados pela enfermidade, resultando assim em prejuízos na ordem de R\$ 6 milhões (SEIFFERT et al., 2006) e cuja produção passou de 4.189 toneladas em 2004 para 272 toneladas em 2012 (SANTOS et al., 2012). Posteriormente, em 2008, houve os primeiros registros oficiais da presença do WSSV em cultivos no Sul da Bahia consolidando assim a presença desse vírus no Nordeste brasileiro (GUERRELHAS e TEIXEIRA, 2012), embora não tenha causado os mesmos efeitos avassaladores e apresentem o mesmo alto grau de patogenicidade registrados no Sul (OIE, 2005).

Durante algum tempo, a carcinicultura brasileira não enfrentou grandes obstáculos, tendo como consequência um dos maiores índices de produtividade mundial. Todavia, nos anos de 2004 e 2005 houve uma queda na produção (-15,84%) e produtividade (-24,84%) ocasionada por diversos fatores, destacando-se a diminuição dos preços internacionais, variação da taxa cambial, bem como a ocorrência de enfermidades (MADRID, 2005; RODRIGUES, 2005). A partir de 2005, houve uma estabilização na produção e produtividade na região Nordeste de 65.000 t e 4.063 kg/ha, respectivamente. Contudo, a crise do setor produtivo ainda persistiu até o final de 2007, principalmente em decorrência da incidência da mionecrose infecciosa (do inglês *infectious myonecrosis*), considerada a principal responsável pelas perdas econômicas e consequente descapitalização setorial (ROCHA, 2007).

PRINCIPAIS POPULAÇÕES DE *L. vannamei* CULTIVADAS NO BRASIL

Dentre as populações de *L. vannamei* comercializadas no mundo podemos destacar as seguintes: (a) livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *specific pathogen free*), (b) de alta sanidade (HH, do inglês *high health*) e (c) resistentes a patógenos específicos (SPR, do inglês *specific pathogen resistant*).

As populações livres de patógenos específicos (SPF) possuem como características ser livres dos principais patógenos notificados pela Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2006), sendo reproduzidas em condições de alta biossegurança com monitoramento periódico das doenças recorrentes exigidas (LIGHTNER, 2005; 2011; MOSS et al., 2003; 2012; PANTOJA et al., 2005; PRUDER, 2004).

As populações resistentes a patógenos específicos (SPR) não estão suscetíveis à infecção por um ou vários agentes patogênicos e possuem alto grau de seleção aplicada por desafios experimentais e convivência com os patógenos no ambiente de cultivo (CUELLER-ANGEL et al., 2012; GITERLE et al., 2005; HENNING et al., 2005; HUANG et al., 2012; LIGHTNER, 2011).

Já as populações de alta sanidade (HH) se caracterizam por serem descendentes de uma dada população de SPF que foram reproduzidas em centros laboratoriais, e que apresentam um monitoramento periódico da presença/ausência dos patógenos excluídos na população SPF que as originou (OTOSHI et al., 2003).

Dentre as populações de *L. vannamei* cultivadas no Brasil, podemos destacar as populações livres de patógenos específicos (SPF), resistentes a patógenos específicos (SPR) e populações de alta sanidade (HH).

Na região Norte e Nordeste do Brasil há a comercialização de uma população de camarões, aqui denominada “SPR”, que se caracteriza por ter progênies cultivadas em condições de campo atingidas pelo IMNV (do inglês *infectious myonecrosis virus*) e IHHNV (do inglês *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*), e estar inserida em um programa de controle de *pedigree* e desafios controlados frente ao IMNV. Os reprodutores são selecionados e certificados como negativos para a presença tanto para IMNV quanto para IHHNV, após sua primeira desova durante os ciclos anuais de reprodução.

Dentre as populações cultivadas no Sul do Brasil no período de 2007 a 2010 podemos destacar duas: uma aqui denominada

“LAGUNA”, que é caracterizada por reprodutores sobreviventes ao surto de WSSV de Santa Catarina, cujos reprodutores foram mantidos em laboratório e certificados como negativos tanto para WSSV quanto para IHHNV, após sua primeira desova durante os ciclos anuais de reprodução (MELLO et al., 2011). A segunda população, aqui denominada “HH”, está sendo produzida no Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC) e consiste em reprodutores oriundos de uma população SPF adquirida comercialmente de uma empresa no estado do Rio Grande do Norte, mantidos e reproduzidos em condições laboratoriais, sob sistema heterotrófico e com certificações de ausência de WSSV, TSV (do inglês *Taura Syndrome Virus*), YHV (do inglês *Yellow Head Virus*), IMNV, NHP (do inglês *Necrotizing hepatopancreatitis*) e IHHNV (FELIPE VIEIRA, *comunicação pessoal*).

ENFERMIDADES E MECANISMOS DE DEFESA ANTI-VIRAIS EM CAMARÕES

Em decorrência da intensificação nos cultivos de peneídeos e aumento da vulnerabilidade imunológica dos animais, não é raro se observar enfermidades advindas por uma grande variedade de microorganismos, especialmente àquelas causadas por vírus e bactérias (FEIJÓ et al., 2013; LIGHTNER et al., 2012; STENTIFORD et al., 2012).

Dentre os microorganismos patogênicos, as enfermidades decorrentes de infecções virais são as que mais afetam a produção da cadeia camaroneira mundial, visto que são as causadoras dos maiores prejuízos aos produtores. Atualmente, são conhecidos mais de 22 agentes virais capazes de infectar camarões peneídeos, sendo quatro deles responsáveis pelos maiores índices de mortalidade em sistemas de cultivo no mundo: o WSSV, o vírus da síndrome da Taura (TSV), o vírus da cabeça amarela (YHV) e o IHHNV (LIGHTNER et al., 2012). No continente americano os vírus que mais afetam as fazendas de camarão são respectivamente o WSSV, o IHHNV, o TSV e o IMNV (do inglês *Infectious Myonecrosis Virus*) (este último, apenas no Brasil) (LIGHTNER et al., 2012).

A fim de auxiliar no diagnóstico dessas enfermidades, o uso de técnicas inclui desde a simples análise clínica e histopatológica até sofisticados métodos moleculares (ANDRADE et al., 2007; COWLEY et al., 2004; KHADIJAH et al., 2003; LIGHTNER et al., 2006; MACKAY et al., 2002).

A síndrome da mancha branca (WSS) é considerada a enfermidade viral mais devastadora para a indústria camaroneira mundial registrada até o momento, sendo que o WSSV vem dizimando populações inteiras nos cultivos (LIGTHNER et al., 2012). Este vírus foi detectado pela primeira vez em 1992, em camarões cultivados no Norte de Taiwan (NAKANO et al., 1994), e desde o seu descobrimento tem se tornado uma das enfermidades mais temíveis para a atividade carcinicultora no mundo (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Segundo Lightner (2012), as perdas na produção devido ao WSSV superaram a marca de 15 bilhões de dólares, desde 1993.

O WSSV causa mortalidades massivas em um período muito curto, sendo que em casos mais severos podem chegar a 100% entre 2 a 7 dias após a detecção dos sinais clínicos (CHANG et al., 1999; CHOU et al., 1995).

Atualmente enfermidades causadas por doenças infecciosas (principalmente por agentes virais) têm sido reconhecidos como um gargalo e ameaça para o setor produtivo de camarões. Isto se deve especialmente ao fato de que existe uma inviabilidade fisiológica de imunizar os crustáceos a longo prazo, utilizando técnicas de vacinação clássica, como ocorre para peixes e anfíbios, que são animais vertebrados (*vide* revisão PERAZZOLO et al., 2012). Estes autores relatam que a inviabilidade de produção de vacinas para crustáceos está relacionada ao fato destes animais serem desprovidos de um sistema imune adquirido, compostos por linhagens clonais linfocíticas (linfócitos T e B), incapacidade de produzir anticorpos e gerar uma memória imunológica a longo prazo.

Assim como os outros invertebrados, os crustáceos são providos somente de um sistema imune do tipo inato, que está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa e onde se encontram as células imunocompetentes, denominadas de hemócitos, que atuam em sinergismo com vários fatores humorais para reconhecer e destruir os microorganismos patogênicos (*vide* revisão de HAUTON, 2012).

Os mecanismos de defesa antiviral desencadeados pelos crustáceos estão basicamente relacionados à indução de proteínas do sistema “*interferon-like*” (HARPENI, 2011) e ao silenciamento dos produtos gênicos virais pelo sistema de interferência por RNA (RNAi) (LABREUCHE e WARR, 2013). Além destes, a apoptose e a autofagia são mecanismos fisiológicos que contribuem para o controle das

infecções virais nesses animais (*vide* revisões de LEU et al., 2013; PERAZZOLO et al., 2012).

Ainda que se tenham alguns resultados positivos, especialmente na utilização de determinados métodos terapêuticos para a prevenção de enfermidades, pouco se conhece ainda a respeito de seus efeitos a nível molecular. Contudo, alguns genes relacionados ao sistema imune de crustáceos têm sido clonados e utilizados como marcadores genéticos em estudos de investigação do mecanismo da ação de substâncias potencialmente imunestimulantes e na identificação de camarões resistentes ou tolerantes a enfermidades (PAN et. al., 2005; WANG et. al., 2008; PERAZZOLO et al., 2012).

HEAT SHOCK PROTEINS 70 (HSP70)

Entre os estudos para avaliar genes associados ao mecanismo da ação de estresse ambiental em camarões destaca-se aqueles com o gene HSP70 codificantes para as chaperonas, pertencentes à superfamília de proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (WU et al., 2008).

As HSPs são codificadas por um pequeno grupo de genes altamente conservados presentes em vertebrados e invertebrados. Essas proteínas podem ser agrupadas em isoformas constitutivas e isoformas induzíveis. As de forma constitutiva são proteínas HSC (do inglês, *heat shock cognate*) expressas em condições fisiológicas normais e agem como chaperonas, sendo portanto, responsáveis pelo correto enovelamento e manutenção da estrutura de outras proteínas (FEDER e HOFMANN, 1999). As formas induzíveis, referidas como HSP, são sintetizadas sob condições de estresse e desempenham um papel na defesa celular (FABBRI et al., 2008), evitando a desnaturação de outras proteínas sob condições de estresse fisiológico.

Entre os fatores estressores que induzem a síntese das HSP estão extremos de temperatura, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons, gases, substâncias tóxicas, metais pesados no meio e agentes infecciosos (ENCOMIO e CHU, 2005; FEDER e HOFMANN, 1999; MORRIS et al., 2013). Por esse motivo a expressão das HSP é utilizada como biomarcador para monitorar condições de estresse

fisiológico e contaminação ambiental a que estão submetidos os animais (PORTE et al., 2001).

HSPs normalmente perfazem aproximadamente 5% do total das proteínas intracelulares. No entanto, sob condições de estresse, seus níveis podem ultrapassar 15% (SRIVASTAV, 2002). A classificação das HSPs é dada em função de seu peso molecular, podendo variar de 15 a 110 kDa (SONG et al., 2010), sendo que a HSP70 é frequentemente utilizada como biomarcador em *L. vannamei* para estresses ambientais (WU et al., 2008; QIAN et al. 2012; ZHOU et al., 2010 a;) ou enfermidades (ZHOU et al., 2010 b; VIEIRA-GIRÃO et al., 2012).

A expressão dos genes HSP70 e HSC70 de *L. vannamei* foi investigada por Qian e colaboradores (2012) frente à variação de temperatura, pH e metais contaminantes (cádmio, ferro, manganês e zinco) na água. Neste estudo foi encontrada uma modulação na expressão gênica das formas das proteínas (HSP e HSC) dependente da variação de temperatura, pH e presença de concentrações subletais de cádmio, ferro, manganês e zinco, concluindo que estes parâmetros ambientais (temperatura, pH e concentrações de metais) poderiam alterar os perfis de expressão dos genes HSP70 e HSC70 em camarões (QIAN et al., 2012).

Morris e colaboradores (2013) descrevem que mudança da conformação é o resultado de estresse no organismo e que o nível de expressão de HSP70 está relacionado com o nível de proteínas parcialmente desdobradas e, portanto, o nível de estresse. Estes autores relatam que há uma vasta gama de fatores que afetam o nível de HSP70 e que cada um desses fatores alteram a sua expressão. Ao usarmos a proteína HSP70 como um biomarcador de estresse, se faz necessário observar os fatores estressores combinados e individualmente, visto que a integração dos fatores estressores poderia alterar os perfis de expressão dos genes (MORRIS et al., 2013; QIAN et al., 2012).

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A variabilidade genética pode ser medida através de vários parâmetros como o polimorfismo, a heterozigotidade, a diversidade

alélica e/ou a distância genética. Cavalli-Sforza and Bodner (1971) definiram polimorfismo genético como a ocorrência, num conjunto de indivíduos, de dois ou mais alelos num *locus*.

Heterozigozidade média observada ($\overline{H_o}$)

A heterozigozidade observada de um dado *locus* é a proporção de indivíduos heterozigóticos observados nesse *locus*. A heterozigozidade média observada é a heterozigozidade observada ponderada pelo número de *locus* estudado. Um indivíduo que tem 2 alelos diferentes num dado *locus* diz-se que é heterozigoto nesse *locus*. Se a população tem 2 ou mais alelos nesse *locus*, e a frequência do alelo mais comum não é maior que 95%, a população diz-se polimórfica nesse *locus*.

Heterozigozidade média esperada ($\overline{H_e}$)

A heterozigozidade esperada (teórica) de um dado *locus* é calculada a partir das frequências alélicas num dado *locus* (Nei, 1975): em que: p_i é a frequência do alelo i de um total de k alelos do *locus* considerado.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

O valor de H_e dividido pelo conjunto de *loci* (n) corresponde à heterozigotia esperada média:

$$\overline{H_e} = \frac{H_e}{n}$$

Outra forma de estudar a variabilidade genética é utilizando os conceitos de frequência alélica e de frequência genotípica. Enquanto as frequências genotípicas indicam unicamente o modo de organização dos alelos em genótipos, as frequências alélicas são as medidas da variação genética. A frequência é uma proporção relativa que varia entre 0 e 1, ou uma porcentagem que varia entre 0 e 100.

Frequências alélicas (F. A.)

A frequência alélica num grupo de indivíduos é a proporção desse alelo relativamente aos outros alelos desse gene. Assim, a frequência alélica pode ser calculada a partir do número observado de diferentes genótipos num dado *locus* ou a partir das frequências genotípicas. A partir do número de genótipos contam-se o número de alelos de um

dado tipo num dado *locus* e divide-se pelo número total de alelos da população. Indivíduos homozigóticos possuem duas cópias de uma mesmo alelo, enquanto que os indivíduos heterozigóticos possuem uma cópia de alelos diferentes. Sendo p a frequência do alelo A , $f(A)$ e q a frequência do alelo a , o cálculo das frequências alélicas segue a fórmula:

$$p = f(A) = \frac{(2x \text{ N de homozigotos}) + (\text{N de heterozigotos})}{(2x \text{ N de homozigotos})}$$

Frequências genotípicas (F.G.)

Considerando uma população de dimensão N , contendo 2 alelos num *locus* (A e a) os genótipos possíveis são: AA , Aa e aa . sendo N_{AA} , N_{Aa} e N_{aa} os respectivos números. Assim: $N = N_{AA} + N_{Aa} + N_{aa}$. As frequências genotípicas serão: $f(AA) = N_{AA}/N$; $f(Aa) = N_{Aa}/N$; $f(aa) = N_{aa}/N$, sendo $f(A)=p$ e $f(a)=q$ as frequências alélicas de A e a , respectivamente, então:

$$p = f(A) = f(AA) + 1/2 f(Aa);$$

$$q = f(a) = f(aa) + 1/2 f(Aa)$$

Análises F

As análises estatísticas F de Wright permitem a caracterização da variabilidade genética entre populações, assim como nos níveis médios de endogamia ao nível populacional. Os três índices F de Wright (F_{is} , F_{IT} e F_{ST}) estão inter-relacionados da seguinte forma (Wright, 1946; 1965):

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

Onde: F_{is} (coeficiente de endogamia): mede a redução de heterozigozidade de um indivíduo devida à reprodução não casual dentro de uma subpopulação, na realidade é o coeficiente de consanguinidade, isto é, a proporção da variância genética de uma subpopulação contida num indivíduo. Um valor elevado de F_{is} implica um nível considerável de consanguinidade.

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

F_{IT} (índice de fixação): mede a redução da heterozigotidade de um indivíduo relativamente ao total da população e reflete o efeito da consanguinidade e deriva genética;

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

F_{ST} (índice de fixação global): mede a redução de heterozigotidade devida à deriva genética dentro de subpopulações, refletindo a diferenciação genética entre subpopulações, na realidade é a proporção de variância genética de uma subpopulação (daí o subscripto s), relativamente à variância genética total (subscripto T).

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Onde: H_I é a heterozigotidade média de um indivíduo para o conjunto dos seus *loci*; H_S é a heterozigotidade de uma subpopulação com reprodução casual ($=2pq$) e H_T é a heterozigotidade do total de uma população total com reprodução casual, podem ser definidos um conjunto de estatísticas descritivas da estrutura genética das populações.

Os seus valores variam de zero a 1, sendo que um valor de F_{ST} alto corresponde a uma diferenciação genética considerável entre populações, podendo ser classificados em pouca (F_{ST} : 0,00-0,05), moderada (F_{ST} : 0,05-0,15), alta (F_{ST} : 0,15-0,25) e muito alta (F_{ST} : >0,25) diferenciação genética.

MELHORAMENTO GENÉTICO E MARCADORES MOLECULARES

Atualmente as técnicas de genética molecular são utilizadas em vários estudos com *L. vannamei*, desde a descrição da variabilidade de plantéis ao diagnóstico de enfermidades, até a caracterização do genoma da espécie. Estes esforços visam, de maneira geral, oferecer ferramentas para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético desta importante espécie de interesse econômico (DE FRANCISCO e GALETTI JR, 2005; PÉREZ et al., 2004; SHEN et al., 2007; ZHANG et al., 2007).

Em estudos de melhoramento genético pode-se empregar um grande número de marcadores moleculares, sendo eles de *loci*

dominantes (RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso; AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) ou co-dominantes (SSR - microsátélites; RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento obtidos por cortes de fita dupla de DNA) (GONÇALVES, 2009). Para *L. vannamei* estudos de estimativa de diversidade foram feitos utilizando marcadores moleculares dominantes (AFLP) e co-dominantes (SSR) (GONÇALVES, 2009; PÉREZ et al., 2004; ZHANG et al., 2007).

O uso de grande quantidade de marcadores moleculares em mapeamento gênico em espécies de interesse econômico se faz necessário visto que esta diversidade de marcadores podem indicar características conhecidas como poligênicas quantitativas ou de herança complexa, denominadas de QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Loci*). As QTLs procuradas são, em sua grande maioria, características herdáveis de interesse econômico resultantes da interação de vários genes (GONÇALVES, 2009), como por exemplo, maior taxa de crescimento ou resistência a alguma enfermidade.

Dos marcadores relatados, os que podemos destacar nos estudos de diversidade genética de populações de *L. vannamei* são os microssátélites e SNPs (FREITAS et al., 2007; GARCIA e ALCIVAR-WARREN, 2007; LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2010; LUVESUTO et al., 2007; MAGGIONI et al., 2013; PEREZ-ENRIQUEZ et al., 2009; TAMAYO, 2006; VELA-AVITÚA et al., 2013; ZENG et al., 2008).

POLIMORFISMOS DE NÚCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)

O polimorfismo de nucleotídeo único ou SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) é a variação de nucleotídeo em uma determinada posição do DNA. O SNP ocorre quando um único nucleotídeo no genoma – A, T, C, ou G – difere entre membros de uma espécie com frequência de pelo menos 1%. Por exemplo, duas sequências de um fragmento de DNA de diferentes indivíduos contém uma diferença em um único nucleotídeo, GGGG(C)CG e GGGG(T)CG. Neste caso diz-se que existem dois alelos: C ou T (BROOKES, 1999).

Assim, na prática, SNPs são marcadores bi-alelcos, podendo ocorrer tri e tetra-alelcos em uma proporção muito menor, de forma que o conteúdo informativo em um único SNP é limitado, em comparação com os marcadores microssátélites (SSR) que são polialélicos (GRIFFIN e SMITH, 2000; GUPTA et al., 2001; ORAGUZIE et al., 2007; SCHLOTTERER, 2004).

Os SNPs podem ser utilizados como marcadores moleculares e são distribuídos por todo o genoma, porém um SNP localizado na região codificadora pode ter impacto relevante na formação e na atividade de uma proteína. Um SNP intrônico pode influenciar o *splicing* do mRNA (KRAWEZAK et al., 1992), assim como, um SNP na região promotora pode influenciar a expressão gênica (DRAZEN et al., 1999).

Além dos estudos de diversidade de DNA, os SNPs podem ser utilizados para identificação de variantes alélicas em regiões codificadoras levando a associação entre o genótipo observado e o fenótipo. Com a utilização do sequenciamento direto de fragmentos específicos do genoma, amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), e subsequente alinhamento e comparação das sequências, pode-se procurar por SNPs em regiões no genoma de interesse. Vários estudos utilizaram essa metodologia para buscar SNPs em genes de interesse em espécies cultiváveis (ABATEPAULO et al., 2008; CALVO et al., 2006; GANAL et al., 2009; LAI et al., 1998; LIAO e LEE, 2010).

Em decorrência desta abundância no material genético estes marcadores podem ser utilizados como uma nova estratégia para estimar a diversidade genética de populações cultivadas de *L. vannamei*, para posteriormente serem utilizados em programas de melhoramento genético (GONÇALVES, 2009) associados a organismos tolerantes e/ou resistentes às doenças virais (ZENG et al., 2008).

Estudo efetuado por Glenn e colaboradores (2005) identificaram a presença de 5 SNPs nos genes α -amilase e cathepsina-L em camarões marinhos (*L. vannamei* e *Penaeus monodon*), relacionados ao ganho de peso corporal dos animais. Em outro estudo para as duas espécies anteriores foram identificados 6 SNPs nos genes codificantes para os hormônios “*molt-inhibiting*” (MIH) e hiperglicêmico de crustáceos (CHH), também relacionados ao ganho de peso corporal dos organismos (YU et al., 2006).

Genes associados ao crescimento de *Macrobrachium rosenbergii* demonstraram a presença de 30 SNPs (nos genes de actina e do hormônio hiperglicêmico de crustáceos), tendo alguns destes uma correlação ao peso corporal, tamanho da carapaça e comprimento padrão (THANH et al., 2010). Em outro estudo, Blank e colaboradores (2013) identificaram 13 SNPs no gene HSC70 de *Macrobrachium amazonicum*. Martin-Martí e colaboradores (2010) realizaram um estudo sobre genes associados ao crescimento e ao sistema imunológico (5HT1R e STAT) de *L. vannamei* e identificaram a presença de 5 SNPs. Esses autores constataram uma correlação do peso corporal com dois destes SNPs.

Outros estudos ainda com *L. vannamei* descreveram 5 SNPs no gene HSP70 e que alguns destes SNPs podem ser utilizados como marcadores moleculares para identificar organismos resistentes ou susceptíveis ao TSV (ZENG et al., 2008).

Devido a grande influência de patógenos virais sobre a cadeia produtiva do cultivo de *L. vannamei*, atualmente se faz necessário o desenvolvimento de populações com características específicas. A elaboração de linhagens (SPF, SPR e HH) é uma estratégia para reduzir as perdas na produção mundial decorrentes de doenças causadas por vírus. Para estimar a diversidade destas populações cultivadas de *L. vannamei* são utilizados atualmente diversos marcadores moleculares.

A integração de informações decorrentes de novos marcadores moleculares com marcadores consagrados, como os microssatélites, seria de grande interesse para o desenvolvimento da carcinicultura. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), em função de sua grande abundância em todo genoma, são os principais candidatos para os estudos envolvendo mais de um marcador no mapeamento genético de espécies cultiváveis (VIGNAL et al., 2002; NARUM et al., 2008). Além disto, os SNPs são marcadores moleculares mais informativos em estudos para associar genótipos a determinados fenótipos de interesse econômico (VIGNAL et al., 2002), visto que estas variações se encontram em uma determinada posição específica na sequência de DNA (BROOKES, 1999).

Se estes SNPs encontrarem na região promotora de genes produtores de proteínas associadas ao sistema imunológico (por exemplo, as famílias das *caspases*, *argonautas* e *HSP*) (DRAZEN et al., 1999), estes polimorfismos poderiam influenciar a suscetibilidade dos organismos aos patógenos, facilitando assim a identificação de um determinado genótipo a um determinado fenótipo de interesse econômico. Garcia e Alcivar-Warren (2007) afirmam que a integração de microssatélites e SNPs no genoma seriam os marcadores moleculares adequados para mapeamento genético de *L. vannamei*. A obtenção de QTLs a partir de diferentes marcadores moleculares (microssatélites e SNPs) possibilitaria então mapeamentos genéticos mais completos para programas de seleção assistida (MAS, do inglês *marker assisted selection*).

A busca de mapeamentos genéticos mais completos, com a integração de microssatélites e SNPs, abre a necessidade da identificação de um maior número de marcadores moleculares associado a características de interesse econômico. Em decorrência disto o presente estudo teve como objetivos:

1. Estudar a diversidade genética do fragmento do gene HSP70 através de Polimorfismos de Nucleotídeo Únicos (SNPs), em três populações de *Litopenaeus vannamei* comercializadas no Brasil.
2. Verificar a relação entre os genótipos dos SNPs no gene HSP70 e a capacidade de *L. vannamei* de sobreviver à infecção causada pelo vírus da síndrome mancha branca (WSSV).

Artigo científico redigido conforme normas e a ser submetido ao periódico AQUACULTURE.

Análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos do gene HSP70 em populações de *Litopenaeus vannamei* em relação à resistência viral
 Ferreira-Jr, A. L.^{a*}; Maggioni, R.^b; Conceição, D.^c; Perazzolo, L. M.^d; Petersen, R. L.^{c**}

^a Mestrando em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. e-mail: alfir_1@hotmail.com; ^b Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Diagnóstico de

Enfermidades de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^c Laboratório de Genética, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, CEP 83.255-976, Pontal do Paraná, PR, Brasil. ** e-mail: rodolfopetersen@ufpr.br; ^d Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88.040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Os objetivos do trabalho foi estudar a diversidade genética do HSP70 através da análise de SNPs em três populações (LV A, LV B e LV C) de *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil e verificar a associação de SNPs e a tolerância ao vírus da Mancha Branca. (WSSV). Um desafio viral foi efetuado com a população LV B (nunca exposta à doença viral). O fragmento (posição 475 a 1594) do gene HSP70 foi amplificado em PCR com os iniciadores específicos. Neste estudo utilizou-se 5 SNPs (C661A, T712C, C782T, C892T e C1090T) presentes nas três populações. A H_o e H_e foram menores nas populações LV A e LV B (sem controle de pedigree) comparadas com LV C (com melhoramento genético de resistência a vírus). O F_{IS} indicou que as populações LV A e LV B possuem maiores coeficientes endogamia (4,5 e 5,0 x maiores, respectivamente) comparadas com a população LV C. Houve uma baixa divergência gênica (F_{ST} : 0,042; G_{ST} : 0,031) e diferenças entre as populações ($p < 0,05$). Uma baixa distância genética ($NeiD$) foi observada entre as populações, com diferença fenotípicas ($p < 0,05$) no SNP C892T entre as populações sem controle de pedigree (LVA e LV B) e a população com melhoramento genético de resistência viral (LV C). No desafio viral não se observou diferenças entre os genótipos e a tolerância ao WSSV, mas com um aumento da frequência no alelo T do SNP C892T. Podemos concluir que existem pequenas diferenças entre as três populações cultivadas no Brasil e uma possível relação do SNPs C892T a doenças virais.

Palavras-chave: WSSV, IMNV, marcadores moleculares, chaperonas,

1. INTRODUÇÃO

Devido a grande influência de patógenos virais sobre a cadeia produtiva do cultivo (Lightner et al., 2012), atualmente se faz necessário o desenvolvimento de populações com características específicas. Entre as linhagens destaca-se a livres de patógenos específicos (SPF) (Moss et al., 2012; Lightner, 2005;), resistentes a patógenos específicos (SPR) (Gitterle et al., 2005; Huang et al., 2012) e populações de alta sanidade (HH) (Otoshi et al., 2003). O desenvolvimento destas linhagens é uma estratégia para reduzir as perdas na produção mundial decorrentes de doenças causadas por vírus (Otoshi et al., 2003; Moss et al., 2012; Lightner, 2005; Cueller-Angel et al., 2012; Huang et al., 2012). No entanto, com o desenvolvimento destas populações específicas pode-se ter uma perda na variabilidade gênica dos seus organismos e um aumento significativo da endogamia (Benzie, 2000, 2009; Vela-Avitúa et al., 2013).

Dentre os marcadores com *loci* específicos destacam-se os SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos), que se caracterizam por ser pequenas alterações (poli-alélicas) em um gene, com frequência acima de 1 % (Brookes, 1999). Estes polimorfismos podem ter uma relevância na formação de proteínas, sendo que SNPs intrônicos podem influenciar o *splicing* do mRNA (Krawczak et al., 1992) e SNPs na região promotora podem influenciar a expressão de genes codificadores para proteínas associadas ao sistema imunológico (por exemplo, as famílias das *caspases*, as *argonautas* e as proteínas de choque térmico, HSP) (Drazen et al., 1999), que , por sua vez, podem influenciar na suscetibilidade/resistência dos organismos a patógenos (Zeng et al., 2008).

No caso dos camarões, estudos avaliando SNPs em peneídeos foram efetuados especialmente com genes associadas à taxa de crescimento e ao sistema imunológico (Glenn et al., 2005; Yu et al., 2006; Zeng et al., 2008; Ciobanu et al., 2009; Martin-Marti et al., 2010; Thanh et al., 2010; Blank et al., 2013). Dentre os genes associados ao mecanismo da ação de estresse ambiental para camarões podemos destacar o gene HSP70 que codifica proteínas denominadas chaperonas (WU et al., 2008), que são sintetizadas sob condições de estresse e que desempenham um papel na defesa celular (Fabbri et al., 2008), evitando a desnaturação protéica. As HSPs normalmente perfazem aproximadamente 5% do total de proteínas intracelulares, no entanto, animais submetidos a condições de estresse, seus níveis podem ultrapassar a 15% (Srivastav, 2002). Os principais agentes estressores

avaliados são extremos de temperatura, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons ou gases, substâncias tóxicas e metais pesados no ambiente e infecções por agentes infecciosos (Feder, 1999; Feder e Hofmann, 1999; Encomio e Chu, 2005; Morris et al., 2013). Por esse motivo, a expressão dos genes HSP70 é utilizada como marcador em processos de estresse fisiológico e contaminação ambiental (Porte et al., 2001). Por outro lado, alterações em sua forma podem afetar a eficiência desta proteína. A HSP70 é frequentemente utilizada para verificar estresses ambientais e de enfermidades em *L. vannamei* (Wu et al., 2008; Zhou et al., 2010 a; Zhou et al., 2010 b; Vieira-Girão et al., 2012; Qian et al. 2012). Estudos realizados com *L. vannamei* analisando cinco SNPs do gene HSP70 demonstraram que alguns destes SNPs podem indicar uma associação entre seus genótipos e a resistência ao TSV (*Taura Syndrome Virus*) (Zeng et al., 2008).

A integração de informações decorrentes de novos marcadores moleculares com marcadores consagrados, como os microssatélites, seria de grande interesse para o desenvolvimento da carcinicultura. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos, em função de sua grande abundância em todo genoma, são os principais candidatos para os estudos envolvendo mais de um marcador nas análises genéticas (Vignal et al., 2002; Narum et al., 2008). Além disto, os SNPs são marcadores moleculares mais informativos em estudos associativos (Vignal et al., 2002), visto que estas variações se encontram em uma determinada posição específica na sequência de DNA (Brookes, 1999). Garcia e Alcivar-Warren (2007) relatam que a integração de microssatélites e SNPs são os marcadores adequados para mapeamento genético de *L. vannamei*. A obtenção de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) a partir de diferentes marcadores moleculares (microssatélites e SNPs) possibilitaria mapeamentos genéticos mais completos para programas de MAS (*Marker Assisted Selection*).

Os objetivos do presente trabalho foi estudar a diversidade genética do gene HSP70 através da análise de SNPs em três populações de *Litopenaeus vannamei* cultivadas no Brasil e verificar a relação entre os genótipos dos SNPs no gene HSP70 e a capacidade de *L. vannamei* de sobreviver à infecção causada pelo vírus da síndrome mancha branca (WSSV). Estudos dessa natureza permitiriam, em um futuro próximo, a identificação de QTLs e a utilização de tecnologia MAS em programas de melhoramento genético.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Origem do material genético

Três populações de *L. vannamei* cultivadas no Brasil foram selecionadas para caracterizar os SNPs do gene HSP70. Duas populações de camarões foram provenientes da região Sul (LAGUNA – LV A e HH – LV B) e uma terceira população da região Nordeste (NE – LV C) (Tabela 1). Amostras de tecido muscular do primeiro segmento abdominal foram fixadas em etanol 96% e armazenadas à -20°C para posterior uso na identificação de SNPs do gene HSP70.

Tabela 1. Características das três populações cultivadas de *L. vannamei* utilizadas nesse estudo.

Populações	Região	Características
LAGUNA (LV A)	Sul (Santa Catarina – Brasil)	Reprodutores selecionados em condições de campo em fazendas atingidas pelo surto do WSSV e certificados negativos após sua primeira desova durante os ciclos anuais de reprodução (n=6), tanto para WSSV quanto para IHNV.
HH (LV B)	Sul (Santa Catarina – Brasil)	Reprodutores oriundos de uma primeira introdução da população SPF comercializada por uma empresa do nordeste do Brasil, sendo as matrizes mantidas e reproduzidas em condições de laboratório “com certificações anuais livres de WSSV” e sem um programa de melhoramento familiar com controle de pedigree.
SPR (LV C)	Nordeste (Rio Grande do Norte - Brasil)	Reprodutores selecionados em condições de campo, condições controladas de cultivo através de um programa de melhoramento genético para resistência ao vírus IMNV através de fortes pressões de seleção, com controle de pedigree, certificados negativos após sua primeira desova durante os ciclos anuais de reprodução, tanto para IMNV quanto para IHNV e comercializada por uma empresa do nordeste do Brasil.*

* Mello et al. (2011)

2.2. Desafio viral

Um experimento controlado foi executado a fim de avaliar a associação entre os genótipos dos camarões e a capacidade de sobrevivência ao WSSV. Para tal, foram utilizados 84 camarões juvenis (12 ± 2 g) de *L. vannamei* oriundos da população Sul (HH) adquiridos no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA), onde foram aclimatados por 8 dias em tanques de 40L (N=10/ tanque) contendo água marinha filtrada, com aeração constante e alimentação com ração comercial ofertada uma vez ao dia, *ad libidum*. Aproximadamente 30% da água dos aquários foi renovada diariamente.

Após a aclimação, os animais foram injetados via subcutânea com 100 µL de solução de inóculo de WSSV (diluição de 10^{-6}), segundo

metodologia descrita em Guertler et al. (2013). Durante todo o desafio viral a mortalidade foi monitorada 3x ao dia, totalizando 15 dias. Amostras do tecido muscular dos animais mortos foram retiradas e estocadas em etanol 70%, a -20°C, para posterior análise molecular. Ao término do experimento, os animais sobreviventes foram sacrificados, amostras musculares foram retiradas e todo o material utilizado, inclusive a água dos aquários foi devidamente desinfetado por 24h com 30 mM de dióxido de cloro (Dioxiplus).

2.3. Extração de DNA genômico e amplificação do gene HSP70

O DNA genômico foi extraído de aproximadamente 20 mg de tecido muscular de 119 animais, utilizando-se kit comerciais (AXYGEN – Biosciences; NORGEN – Biotek Corp.), segundo especificações dos fabricantes. O fragmento de 1119pb (posição de 475 até 1594) do gene HSP70 (Figura 1) foi amplificado em termociclador Swift MaxPro (ESCO) com os iniciadores (forward: 5'-TCT CGG GTC TGA ATG TGC-3' e reverse: 5'-GAA ATA CGG TCC CTC TGC-3') (ZENG et al., 2008). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi efetuada com um volume final de 10µL, contendo neste 50 ng de DNA genômico; 1,5 mM MgCl₂; 0,04 mM de mix de dNTPs; 0,6 µM de iniciadores; 2,5 U Taq DNA polimerase (Promega, USA) e tampão (Promega, USA). O protocolo de PCR consiste em uma desnaturação inicial do DNA durante 2 minutos a 95,0 °C; seguido de 35 ciclos a 94 °C / 30s; 56 °C / 45s e 72 °C / 1 min. E para extensão final foi utilizado um período de 10 minutos a 72,0 °C.

2.4. Genotipagem dos SNPs

O sequenciamento dos fragmentos com o gene HSP70 foi realizado em um seqüenciador automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) com o ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Ceará. A reação foi efetuada com um volume final de 10µL, contendo neste 70-100 ng de DNA do fragmento do gene HSP70; 0,32 µM de iniciador; 1,0 µL da solução BigDYE 3.1 e tampão (BigDYE 3.1). Os fragmentos foram sequenciados por termociclagem incluindo 1 ciclo a 96 °C/1min e 35 ciclos 96°C/1 s; 50°C/5 s; 60°C/4 min. Em seguida foram precipitadas com isopropanol (Sambrook et al., 1989) e ressuspensas em 10 µL de formamida e lidas no seqüenciador.

2.5. Análise dos dados

As sequências foram alinhadas empregando o algoritmo Clust W, identificadas os genótipos de cada *locus* estudado para cada indivíduo e confirmados visualmente utilizando o programa MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011), tendo como referência a sequência do gene HSP70 (GenBank - AY645906). As frequências alélicas, genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, F_{IS} , F_{ST} e G_{ST} foram obtidos com o auxílio dos programas GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) e GenAEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). As frequências alélicas foram testadas com teste de X^2 par a par dos grupos, usando o programa STATISTICA 10.0 demo (StatSoft Ltd., 2012). A distância genética (Nei, 1977) foram obtidas usando o programa GenAEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012) com permutação de 9.999.

3. RESULTADOS

3.1. Diversidade genética

Foram identificados 5 SNPs (C661A, T712C, C782T, C892T e C1090T) genotipados em 119 camarões, com substituições sinônimas (Figura 1). Foi observado nas três populações 19 genótipos, sendo 12 destes exclusivos de uma das populações estudadas (Tabela 2). As populações do Sul não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p<0,05$) em 60 % (LV A) e 100% (LV B) dos testes. Para a população do Nordeste (LV C) 20 % dos testes não se encontravam em EHW ($p<0,05$).

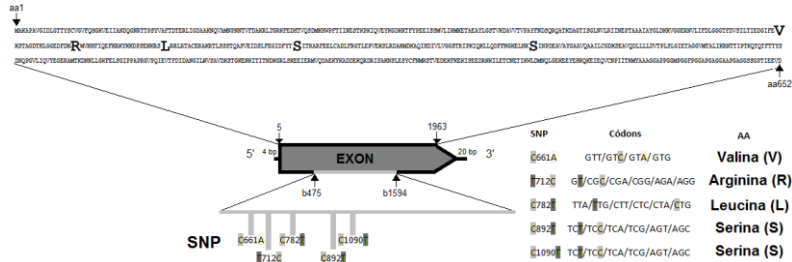


Figura 1. Esquema da estrutura genômica e distribuição de SNPs no gene HSP70 de *L. vannamei*. Linha cinza claro representa o fragmento do gene; setas indicam o início e fim do fragmento e da expressão da proteína HSP70; aminoácidos contendo os SNPs foram representados em diferente fonte.

Tabela 2. Haplótipos dos SNPs dos fragmentos dos exons do gene HSP70 das populações cultivadas de *L. vannamei* no Brasil. * fragmento da sequência do gene HSP70 de *L. vannamei* (Genbank: AY645906); LVA – população LAGUNA (Sul); LVB – população HH (Sul); LVC – população SPR (Nordeste); 1 a 19 – genótipos.

HSP70 5'-	C661A	T712C	C782T	C982T	C1090T	-3'
REF *	C	T	C	C	C	
LVA 1	C	C	C	C	C	
LVB 1	C	C	C	C	C	
LVC 1	C	C	C	C	C	
LVA 2	C	C	C	Y	Y	
LVC 2	C	C	C	Y	Y	
LVA 3	C	C	C	Y	C	
LVB 3	C	C	C	Y	C	
LVC 3	C	C	C	Y	C	
LVA 4	A	C	C	Y	Y	
LVA 5	A	C	C	C	C	
LVB 5	A	C	C	C	C	
LVA 6	C	C	C	T	C	
LVB 6	C	C	C	T	C	
LVA 7	C	C	C	T	T	
LVA 8	C	C	C	C	Y	
LVA 9	M	C	C	C	C	
LVC 9	M	C	C	T	C	
LVA10	C	C	C	T	T	
LVB10	C	C	C	C	T	
LVC11	C	Y	C	C	Y	
LVC12	C	C	C	Y	T	
LVB13	C	C	T	Y	Y	
LVB14	M	C	C	C	C	
LVB15	A	C	C	C	C	
LVB16	C	T	C	T	C	
LVB17	A	T	C	T	C	
LVB18	C	T	C	C	C	
LVB19	C	Y	C	C	Y	

A heterozigiosidade observada (H_o) foi menor nas populações LV A (52,26% menor) e LV B (25,51% menor) comparadas com LV C. A heterozigiosidade esperada (H_e) mostrou uma variação média de 16,1 % ($\pm 1,3$) a 21,9 % ($\pm 2,4$), tendo as populações do Sul (LV A e LV B) menores valores comparadas com a população do Nordeste (LV C). O F_{IS} indicou que as populações do Sul (LV A e LV B) possuem maiores coeficientes de endogamia (4,5 e 5,0 x maiores, respectivamente) comparadas com a população do Nordeste (LV C) (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genética dos SNPs presentes no fragmento do gene HSP70 das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR) de *Litopenaeus vannamei* cultivadas no Brasil. Heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de endogamia (F_{IS}), equilíbrio de Hardy–Weiberg (EHW) e número de indivíduos (N). DP- desvio padrão; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

Populações (N)		Locus					Médias (\pm DP)
		C661A	T712C	C782T	C892T	C1090T	
LV A (41)	Ho	0,028	0,000	0,000	0,317	0,289	0,127 (\pm 0,16)
	He	0,176	0,097	0,049	0,424	0,284	0,206 (\pm 0,15)
	F_{IS}	0,842	1,000	1,000	0,252	-0,021	0,615 (\pm 0,47)
	EHW	0,000 ***	0,000***	0,000 ***	0,107	0,898	-----
	N	36	39	40	41	38	
LV B (45)	Ho	0,022	0,044	0,000	0,178	0,067	0,062 (\pm 0,07)
	He	0,105	0,162	0,044	0,391	0,105	0,219 (\pm 0,24)
	F_{IS}	0,788	0,726	1,000	0,545	0,365	0,685 (\pm 0,24)
	EHW	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,014 *	-----
	N	45	45	44	45	45	
LV C (33)	Ho	0,031	0,125	0,000	0,697	0,364	0,243 (\pm 0,29)
	He	0,031	0,117	0,000	0,483	0,463	0,161 (\pm 0,13)
	F_{IS}	-0,016	-0,067	1,000	-0,442	0,214	0,138 (\pm 0,54)
	EHW	0,928	0,706	-----	0,011 *	0,218	-----
	N	32	32	32	33	33	

A média dos alelos mais frequentes (C) foi de 0,868 (\pm 0,136) e de 0,133 (\pm 0,136) para os alelos menos frequentes (A ou T). Diferenças estatísticas foram observadas para o SNP C1090T ($p < 0,05$) entre as três populações. Para o SNP C892T houve diferenças estatísticas ($p < 0,001$) entre as populações do Sul (LV A e LV B) e do Nordeste (LV C). Para o SNP C661T houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a população LV A (Sul) e LV C (Nordeste) (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição da frequência alélica dos *locus* do gene HSP70 e teste de X^2 par a par das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; número de indivíduos (N).

SNPs	Alelos	Frequência Alélica (N)			Comparação múltipla da frequência alélica (p)		
		LV A	LV B	LV C	LV A-LV B	LV A-LV C	LV B-LV C
C661A	C	0,903 (65)	0,944 (85)	0,984 (63)	1,01 (0,314)	4,07 (0,043) *	1,59 (0,207)
	A	0,097 (07)	0,056 (05)	0,016 (01)			
T712C	T	0,051 (04)	0,089 (08)	0,062 (04)	0,89 (0,345)	0,08 (0,773)	0,36 (0,547)
	C	0,949 (74)	0,911 (82)	0,938 (60)			
C782T	C	0,975 (78)	0,977 (86)	1,000 (64)	0,01 (0,923)	1,62 (0,203)	1,47 (0,225)
	T	0,025 (02)	0,023 (02)	0,000 (00)			
C892T	C	0,695 (57)	0,733 (66)	0,591 (39)	0,31 (0,579)	51,25 (0,0) ***	58,56 (0,0) ***
	T	0,305 (25)	0,267 (24)	0,409 (27)			
C1090T	C	0,829 (63)	0,944 (85)	0,636 (42)	5,69 (0,017) *	6,80 (0,009) **	23,88 (0,0) ***
	T	0,171 (13)	0,056 (05)	0,364 (24)			

Houve uma baixa divergência gênica entre as populações (F_{ST} : 0,042; G_{ST} : 0,031). Os valores de F_{ST} e G_{ST} quando comparados par a par entre as populações indicam baixa divergência genética e estatisticamente significativos, com exceção do G_{ST} entre as populações LV A e LV B ($p < 0,05$) (Tabela 5). Uma baixa distância genética (*NeiD*) foi observada entre as populações com uma maior proximidade entre as populações do Sul (LVA e LV B) se comparadas com a população do Nordeste (LV C). (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de diferenciação populacional (G_{ST} e F_{ST}) e distância genética (*NeiD*) analisadas par a par das populações LV A (LAGUNA), LV B (HH) e LV C (SPR). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

Populações		F_{ST}	G_{ST}	<i>Nei D</i>
LV A	LV B	0,028*	0,001	0,004
LV A	LV C	0,032**	0,034*	0,014
LV B	LV C	0,091***	0,096***	0,029

3.2. Desafio Viral

Durante o desafio viral foi observado uma mortalidade de 84,5 % dos animais. Os camarões sobreviventes (15,5 %) demonstraram maior predominância do genótipo CC, tendo os SNPs C661A e C782T a ocorrência exclusiva deste genótipo. E para o SNP C892T observou-se um aumento na frequência do alelo T (0,31) nos animais sobreviventes. Os testes de X^2 não indicaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) da frequência alélica dos cinco SNPs estudados entre os camarões mortos e sobreviventes (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados do teste de desafio da população LV B (HH) frente ao WSSV. Frequência alélica (F. A.), frequência genotípica (F. G.), número de indivíduos (N) e análise do teste de X^2 para cada *locus* do gene HSP70.

SNPs	WSSV - Mortos (32)					WSSV - Sobreviventes (13)					Comparação frequência alélica: X ² (p)
	F. A. (N)		F. G. (genótipo)			F. A. (N)		F. G. (genótipo)			
C661A	0,92 (59)	0,08 (03)	0,91 (CC)	0,03 (CA)	0,06 (AA)	1,00 (26)	0,00 (00)	1,00 (CC)	0,00 (CA)	0,00 (AA)	1,30 (0,55)
T712C	0,09 (06)	0,91 (58)	0,06 (TT)	0,06 (TC)	0,88 (CC)	0,08 (02)	0,92 (24)	0,08 (TT)	0,00 (TC)	0,00 (CC)	0,06 (1,00)
C782T	0,97 (60)	0,03 (02)	0,97 (CC)	0,00 (CT)	0,03 (TT)	1,00 (26)	0,00 (00)	1,00 (CC)	0,00 (CT)	0,00 (TT)	0,86 (1,00)
C892T	0,75 (48)	0,25 (16)	0,65 (CC)	0,19 (CT)	0,16 (TT)	0,69 (18)	0,31 (08)	0,62 (CC)	0,15 (CT)	0,23 (TT)	0,31 (0,60)
C1090T	0,94 (60)	0,06 (04)	0,91 (CC)	0,06 (CT)	0,03 (TT)	0,96 (25)	0,04 (01)	0,92 (CC)	0,08 (CT)	0,00 (TT)	0,04 (1,00)

4. DISCUSSÃO

As análises da diversidade genética de linhagens cultiváveis são determinantes para programas de melhoramento genético e aumento da produtividade na carcinicultura (Benzie, 2000; Benzie, 2009; Cook, 2009; Andriantahina et al., 2013). De um modo geral, a perda na variabilidade genética é esperada em populações cultivadas, devido ao efeito fundador e de endogamia (Benzie, 2000; Benzie, 2009). As três populações avaliadas neste estudo apresentaram baixos níveis de diversidade genética no fragmento do gene HSP70, sendo que a baixa heterozigosidade observada nas populações do Sul (LV A e LV B) pode estar relacionada com os elevados índices de endogamia presentes nestas duas linhagens.

A maior heterozigosidade observada foi na população LV C, quando comparada com as populações LV A e LV B, sendo este resultado esperado haja vista que os reprodutores utilizados faziam parte de um programa genético com controle de cruzamentos que maximizou a variabilidade genética de geração em geração (Melo et al., 2011). Este

programa de melhoramento genético para resistência ao IMNV, pode ter resultado em um aumento da heterozigosidade observada no SNP C892T. A menor heterozigosidade registrada, quando comparada com a heterozigosidade esperada em populações cultiváveis, pode estar associada à seleção artificial e à deriva genética (decorrentes do pequeno número de reprodutores), afetando assim o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Freitas et al., 2007; Perez-Enriquez et al., 2009; Lima et al., 2010; Vela-Avitúa et al., 2013).

O índice de endogamia (F_{IS}) mostrou valores mais elevados para as populações do Sul (LV A e LV B) em relação à população do Nordeste (LV C), possivelmente pelo fato de que a população nordestina avaliada apresentava um histórico de cruzamentos ao longo das gerações, mantendo este parâmetro baixo. Lima et al., (2008) observaram menor endogamia (F_{IS} : 0,13 a 0,39) em populações cultivadas de *L. vannamei* no estado da Bahia (Nordeste). Outros estudos efetuados com populações de *L. vannamei* oriundas de laboratórios de produção de pós-larvas brasileiras confirmaram menores índice de endogamia (F_{IS} : 0,00 a 0,38). Os maiores valores de F_{IS} observados nas populações do Sul pode estar relacionado ao endocruzamento e à influência do efeito fundador dos reprodutores (Luvesuto et al., 2007; Lima et al., 2010; Maggioni et al., 2013). Os valores do F_{IS} da população LV C foram similares àqueles de outros estudos com populações de peneídeos cultivados no Brasil (Lima et al., 2008; Luvesuto et al., 2007; Lima et al., 2010; Maggioni et al., 2013), assim como em populações cultivadas (F_{IS} : 0,20 a 0,28) no México (Vela-Avitúa et al., 2013).

A reduzida divergência genética observada entre as três populações estudadas foram similares ao trabalho de Lima et al. (2010), os quais identificaram ligeira divergência genética (F_{ST} : 0,02) entre dois laboratórios de produção da pós-larvas da região nordestina do Brasil. Luvesuto et al. (2007) observaram esta baixa divergência (F_{ST} : -0,004) em camarões cultivados no estado da Bahia (Nordeste). Em estudos efetuados com populações de seis instituições produtoras de pós-larvas, em quatro estados do México, observou-se uma baixa diversidade (F_{ST} : 0,015) (Perez-Enriquez et al., 2009). Oposto a isto, Maggioni et al. (2013) observaram uma maior variabilidade na divergência em nove dos maiores laboratórios de produção de pós-larvas da região Nordeste do Brasil (F_{ST} : 0,00 a 0,175), sendo estes responsáveis por 50% das pós-larvas comercializadas no país. A maior divergência dos laboratórios nordestinos são decorrentes das múltiplas origens dos reprodutores oriundos de populações nativas e cultivadas de diversos países

(Equador, Panamá, Venezuela, El Salvador, e México) (Luvesuto et al., 2007; Lima et al., 2010; Maggioni et al., 2013).

Uma ligeira distância genética ($NeiD < 0,01$) foi observada nas três populações estudadas, tendo uma maior proximidade das populações do Sul (LV A e LVB) comparada com a população do Nordeste (LV C). Estudos com linhagens cultivadas no Brasil de *L. vannamei* mostraram uma relação da distância genética e sua localização geográfica (Maggioni et al., 2013). Além disto, as estratégias de seleção dos reprodutores (Luvesuto et al., 2007) e diferenças nas características oceanográficas (físico-químicas e biológicas) e climatológica dos estuários podem levar a um efeito diferencial do ambiente na estrutura genética das populações (Benzie, 2000; Maggioni et al., 2001; Maggioni et al., 2007; Maggioni et al., 2013).

As frequências alélicas do SNP C892T apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre a população LV C e as populações LV A e LV B. Resultados similares foram observados com três populações comercializadas de *L. vannamei* na Ásia, sendo duas SPF e uma resistente ao TSV (Zeng et al., 2008). A população LV C é oriunda de um programa de melhoramento genético para resistência ao IMNV, onde os animais sofreram fortes pressões de seleção a este vírus através de desafios experimentais.

No entanto, quando camarões da população LV B foram desafiados experimentalmente ao vírus WSSV não foram registradas diferenças significativas entre as frequências alélicas dos SNPs do gene HSP70 dos animais mortos e sobreviventes. A população LV B se caracteriza por ser originada de uma população SPF que foi reproduzida em condições de biossegurança sem ter entrado em contato com o WSSV no seu histórico zootécnico e com seleção de organismos que possuem maior capacidade de crescimento. Apesar desta ausência de associação observou-se, de maneira interessante, a ocorrência exclusiva do genótipo CC nos SNPs C661A e C782T e a predominância do genótipo TT do SNP C892T para os animais sobreviventes. Zeng et al. (2008) identificaram diferenças na frequências alélicas ($p < 0,05$) do SNP C892T e associação dos genótipos CT e TT a resistência ao TSV (*Taura Syndrome Vírus*). Mesmo com baixo número amostral do presente estudo ($N=45$), o aumento do genótipo TT no SNP C892T observado associado ao desafio viral, pode indicar que este *locus* também pode estar associado à tolerância ao WSSV. A ausência de associação também foi observada em primeira instância entre os SNPs do gene CHH (hormônio hiperglicêmico de crustáceos) e taxa de crescimento de

duas espécies de peneídeos (*L. vannamei*, *Penaeus monodon*), com um número amostral de 30 a 76 indivíduos (Glenn et al., 2005; Yu et al., 2006). Posteriormente, Than et al. (2010) observaram esta associação de SNPs do gene CHH com a taxa de crescimento para *Macrobrachium rosenbergii* com um número amostral de 243 animais.

Estas pequenas alterações (poli-alélicas) dos SNPs podem ter uma relevância na busca futura por animais mais tolerantes e /ou resistentes a patógenos virais, visto que estas alterações podem ter uma influência na formação e eficiência de proteínas (Krawezak et al., 1992). Yu et al. (2006) observaram que o SNP G59A do gene CHH provoca uma alteração em um aminoácido (C para Y), afetando sua eficiência metabólica. Mesmo que as alterações dos SNPs presentes no gene HSP70 resultem em aminoácidos com estrutura similar, a diferença bioquímica nestes aminoácidos pode afetar a atividade do RNA transportador (Hunt et al., 2009) da proteína HSP70 e assim influenciar na suscetibilidade às doenças virais.

Podemos concluir que há uma reduzida divergência e distância genética entre as duas populações cultiváveis no Sul (LV A e LV B) comparado com uma população do Nordeste (LV C) do Brasil. O SNP C892T do gene HSP70 apresenta potencial em ser utilizado como marcador em estudos de associação à resistências virais (WSSV e IMNV). No entanto, para consolidar esta relação do SNP C892T presentes no gene HSP70 de *L. vannamei* associados à resistência de doenças virais (IMNV, TSV e WSSV), aconselha-se uma confirmação com outros desafios virais. Outra necessidade futura é a integração do SNP C892T presentes no gene HSP70 e outros SNPs presentes em genes associados a características de interesse econômico (taxa de crescimento e sistema imunológico). Estudos de associação permitiriam, em um futuro próximo, mapeamentos genéticos mais completos para programas de seleção assistida.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Financiadora de Estudos e Pesquisa (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de incentivo à pesquisa e aos colaboradores do Centro de Estudos do Mar - UFPR, Centro de Centro de Biológica - UFSC e Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos - UFC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andriantahina, F., Liu, X., Feng, T., Xiang, J. 2013. Current Status of Genetics and Genomics of Reared Penaeid Shrimp: Information Relevant to Access and Benefit Sharing. *Mar Biotechnol.* 15, 399–412. DOI 10.1007/s10126-013-9500-9
- Benzie, J. A. H. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research.* 31, 95-119.
- Benzie, J. A. H. 2009. Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. *Aquaculture.* 1, 232-250. doi: 10.1111/j.1753-5131.2009.01018.x
- Blank, D. V.; Valenti, W. C.; Freitas, P. D.; Galetti-Jr, P. M. 2013. Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Conservation Genet Resour.* 5(3), 631-633. DOI 10.1007/s12686-013-9867-y.
- Borba, M. 2014. Balança comercial de pescado do Brasil – março de 2014. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão. abril de 2014; disponível em: <http://abccam.com.br/site/balanca-comercial-de-pescado-do-brasil-marco-de-2014/>
- Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. *Gene.* 234(2), 177-186.
- Ciobanu, D. C.; Bastiaansen, J. W. M.; Magrin, J.; Rocha, J. L.; Jiang, D.-H.; Yu, N.; Geiger, B.; Deeb, N.; Rocha, D.; Gong, H.; Kinghorn, B. P.; Plastow, G. S.; Van der Steen, H. A. M.; Mileham, A. J. 2009. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animal Genetics.* 2009. DOI:10.1111/j.1365-2052.2009.01961.x.
- Cook, J.; Gitterle, T.; Salazar, M.; Morten Rye, M. 2009. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. *Aquaculture.* 286, 1–11.
- Cuellar-Anjel, J.; White-Noble, B.; Schofield, P.; Chamorro, R.; Lightner, D. V. 2012. Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a anamanian breeding program, *Aquaculture.* 368, 36-39. doi: 10.1016/j.aquaculture.
- De Francisco, A. K.; Galetti-Jr, P. M. 2005. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology.* 28(2), 258-261.
- Drazen, J. M.; Yandava, C. N.; Dube, L.; Szczerback, N.; Hippensteel, R.; Pillari, A.; Israel, E.; Schork, N.; Silverman, E. S.; Katz, D. A.; Encomio, V. G.; Chu, F. L. E. 2005. Seasonal variation of Heat Shock Protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Derma). *Journal of shellfish research.* 24, 167–175,

- Fabbri, E.; Valbonesi, P.; Franzellitti, S. 2008. HSP expression in bivalves. *Invertebrate survival journal*. 5, 135–161.
- FAO, 2012. El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. Roma.
- FAO, 2014. Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. Roma.
- Feder, M. E. 1999. Organismal, Ecological and Evolutionary Aspects of Heat-Shock Proteins and the Stress Response: Established Conclusions and Unresolved Issues. *Amer. Zool.* 39, 857–864.
- Feder, M. E.; Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*. 61, 243–282.
- Freitas, P. D.; Jesus, C. M.; Galetti Jr, P. M. 2007. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. *Molecular Ecology*, 7, 324–326. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01595.x
- Garcia, D.; Alcivar-Warren, A. 2007. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. *Journal of Shellfish Research*, 26(4), 1203–1216.
- Gitterle, T.; Salte, R.; Gjerde, B.; Cock, J.; Johansen, H.; Salazar, M.; Lozano, C.; RY, M. 2005. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*. 246, 139–149.
- Gitterle, G. T.; Ødegard, J.; Gjerde, B.; Rye, M.; Salte, R. 2006. Genetic parameters and accuracy of selection for resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using different statistical models. *Aquaculture*. 251, 210–218.
- Glenn, K. L.; Grapes, L.; Suwanasopee, T.; Harris, D. L.; Li, Y.; Wilson, K.; RotHSChild, M. F. 2005. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. *Animal Genetics*. 36, 235–236. doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01274.x.
- Guertler, C.; Rieg, T.; Mejia-Ruiz, C.; Lehmann, M.; Barracco, M. A.; Perazzolo, L. M. 2013. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48(8), 983–990.

- Henning, O.; Arce, S. M.; Moos, S. M.; Pantoja, C. R.; Lightner, D. V. 2005. Development of a specific pathogen free population of the Chinese fleshy prawn, *Fenneropenaeus chinensis* Part II. Secondary quarantine. *Aquaculture*. 250, 579–585.
- Huang, Y.; Yin, Z.; Weng, S.; He, J.; Li, S. 2012. Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*. 364–365. 111–117.
- Hunt, R.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Gottesman, M. M.; Kimchi-Sarfaty, C. 2009. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? In: *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, v. 578, pp. 23–39.
- Krawczak, M.; Reiss, J.; Cooper, D.N. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*. 90, 41–54.
- Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. *Journal of the World Aquaculture Society*. 36 (3), 229–248.
- Lightner, D. V.; Redman, R. M.; Pantoja, C. R.; Tang, K. F. J.; Noble, B. L.; Schofield, P.; Mohny, L. L.; Nunan, L. M.; Navarro, S. A. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of invertebrate pathology*. 110 (2), 174–183.
- Lima, A. P. S.; Santos, A. C. L.; Dantas, H. L.; Gomes-Filho, M. A.; Maggioni, R.; Coimbra, M. R. M. 2008. Genetic monitoring of broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in a closed rearing system in Pernambuco, Brazil. *Aquaculture Research*. 39, 1461–1466. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02022.x
- Lima, A. P. S.; Silva, S. M. B. C.; Oliveira, K. K. C.; Maggioni, R.; Coimbra, M. R. M. 2010. Genetics of two marine shrimp hatcheries of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*. 40(2), 325–331.
- Luvesuto, E.; Freitas, P. D.; Galetti Junior, P. M. 2007. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30 (4), 1156–1160.
- Maggioni, R.; Rogers, A. D.; Maclean, N.; D’Incao, F. 2001. Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18(1), 66–73.
- Maggioni, R.; Rogers, A. D.; Maclean, N. 2007. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast

- identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 12, 3213–3217.
- Maggioni R. M.; Coimbra, M. R. M.; Costa, R. B.; Diniz, F. M.; Molina, W. F.; Oliveira, D. M.; Puchnick-Legat, A. 2013. Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. *Pesq. agropec. bras.* 48(8), 968-974. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800023
- Martin-Marti S.; Onteru, S.K.; Du, Z. Q.; RothSchild, M. F. 2010. SNP analyses of the 5HT1R and STAT genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Span J. Agric Res.* 8(1), 53-55.
- Mello, C. C.; Delsol, G. Y. L.; Motte, E.; Escobar, V. A. C.; Rey, P. F.; Martins, M. L.; Arana, L. A. V.; Mello, G. L. 2011. Selection of shrimp breeders free of white spot syndrome and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis. *Pesq. agropec. bras.* 46(5), 531-537.
- Morris, J. P.; Thatje, S.; Hauton, C. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular Ecology*. 22, 1494–1502.
- Moss, S. M; Steve M.; Arce, S. M.; Moss, A. D. 2003. SPF Defined: Pathogen-Free Status of Shrimp Limited. *Global Aquaculture Advocate*. 1, 86-87.
- Moss, S. H.; Moss, D. S.; Arce, S. M.; Lightner, D. V.; LOTZ, J. M. 2012. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110, 247–250.
- Narum, S. R.; Banks, M.; Beacham, T. D.; Bellinger, M. R.; Campbell, M. R. Dekoning, J. ; Elz, A.; Guthrie III, C. M.; Kozfkay, C.; Miller, K. M.; Moran, P.; Phillips, R.; Seeb, W.; Smith, C. T.; Warheit, K.; Young, S. F.; Garza, J. C. 2008. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*. 17, 3464–3477. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03851.x
- Otoshi, C. A.; Arce, S. M.; Moss, S. M. 2003. Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. *Aquacultural Eng.* 29, 93–107.
- Pérez, F. 2004. A sex-specific linkage map of the White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture*. 242, 105-118.
- Perez-Enriquez R.; Hernández-Martínez, F.; Cruz, P. 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture*. 297, 44–50.

- Peakall R.; Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 28, 2537-2539.
- Porte, C.; Biosca, X.; Sole, M.; Albaigés J. 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environmental pollution*. 112, 261-268.
- Qian, Z.; Liu, X.; Wang, L.; Wang, X.; Li, Y.; Xiang, J.; Wang, P. 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 156(3), 211-220.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*. 8, 103-106.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nolan, C. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Srivastav, P. 2002. Roles of heat – shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature reviews immunology*. 2 (3), 185-194.
- Thanh, N. M.; Barnes, A. C.; Mather, P. B.; Li, Y., Lyons, R. E. 2010. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 301, 7–15.
- Vela-Avitúa, S.; Montaldo, H.H.; Márquez-Valdelamar, L.; Campos-Montes, G.R.; Castillo-Juárez, H. 2013 . Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16(4), 9-9. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-11>
- Vieira-Girão, P. R. N.; Rocha, I. R. C. B.; Costa, F. H. F.; Rádís-Baptista, G. 2012. Differential induction of HSP-70 expression in response to IHNV in white shrimp *Litopenaeus vannamei* naturally co-infected with IHNV and IMNV. *International Aquatic Research*. 4(1), 1-13. doi:10.1186/2008-6970-4-17
- Vignal, A.; Milan, D.; Sancristobal, M.; Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34, 275-305. DOI:10.1051/gse:2002009.

- Wu, R.; Sun, Y.; Lei, L. M.; Xie, S. T. 2008. Molecular Identification and Expression of Heat Shock Cognate 70 (*HSC70*) in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Biology*. 42(2), 234–242.
- Yu, M; Cheng, Y.; RotHSChild, M. F. 2006. SNP analysis of Molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Arch. Tierz.* 49(4), 411-412.
- Zeng, D.; Chen, X.; Li, Y.; Peng, M.; Ma, N.; Jiang, W.; Yang, C.; Li, M. 2008. Analysis of HSP70 in *Litopenaeus vannamei* and detection of snps. *Journal of Crustacean Biology*. 28(4), 727–730.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W. N., He, W. Y., Wang, A. L., & Liu, Y. 2010a. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* *Journal of Thermal Biology*. 35(6), 284-289.
- Zhou, J., Wang, W. N., He, W. Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., Wang, A. L. 2010b. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of invertebrate pathology*. 103(3), 170-178.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para consolidar esta relação do SNP C892T presentes no gene HSP70 de *L. vannamei* associados à doenças virais (IHNV, IMNV, TSV e WSSV), aconselha-se uma confirmação com outros desafios virais com um maior número amostral. Além de efetuar mais estudos integrando o SNP C892T presentes no gene HSP70 e outros SNPs presentes em genes associados a características de interesse econômico (taxa de crescimento e sistema imunológico). Dentre os genes que possuem potencial para serem utilizados podemos destacar os genes HSC70, α -amilase, catepsina-L, MIH, actina, CHH, 5HT1R e STAT (Glenn et al., 2005; Yu et al., 2006; Zeng et al., 2008; Marti et al., 2010; Than et al., 2010; Blank et al., 2013). A obtenção de QTLs conjuntas de tolerância a doenças virais e taxa de crescimento possibilitaria uma alternativa em programas de seleção assistida (MAS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABATEPAULO, A. R.; CAETANO, A. R.; MENDES-JR.; C. T.; CARVALHO, W. A.; FERREIRA, B. R.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Animal Genetics**, v. 39, n. 3, p. 328-329, 2008.

ARGUE, B. J.; ARCE, S. M.; LOTZ, J. M.; MOSS, S. M. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. **Aquaculture**, v. 204, n. 3, p.447-460, 2002.

BENZIE, J. H. A. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v. 32. p. 95-119, 2000.

BLANK, D. V.; VALENTI, W. C.; FREITAS, P. D.; GALETTI-JR, P. M. Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Conservation Genetics Resources**, v. 5, n.3, p. 631-633, 2013. DOI 10.1007/s12686-013-9867-y.

BORBA, M. Balança comercial de pescado do Brasil – março de 2014. **Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Abril de 2014; disponível em: <http://abccam.com.br/site/balanca-comercial-de-pescado-do-brasil-marco-de-2014/>; acesso em maio de 2014.

BROOKES A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CALVO J. H.; MARTÍNEZ-ROYO A.; SILVERI L.; FLORIOT, S.; EGGEN, A.; MARCOS-CARCAVILLA, A.; SERRANO, M. Isolation, mapping and identification of SNPs for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on BTA3. **Cytogenetics and Genome Research**, v.114, n. 1, p.39-43, 2006.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; BODMER. W. F. 1971. The genetics of human populations. W. H. Freeman, San Francisco.

CHANG CF, SU MS, CHEN HY, LO CF, KOU GH, LIAO IC. Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36, p. 163–8, 1999.

CHOU HY, HUANG CY, WANG H, CHIANG HC, LO CF. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165-173, 1995.

COWLEY, J. A.; CADOGANA, L. C.; WONGTEERASUPAYA, C.; HODGSONA, R. A. J.; BOONSAENG, V.; WALKER, P. J. Multiplex RT-nested PCR differentiation of gillassociated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. **Journal of Virological Methods**. v. 117, p. 49-59, 2004.

CUELLAR-ANJEL, J.; WHITE-NOBLE, B.; SCHOFIELD, P.; CHAMORRO, R.; LIGHTNER, D. V.; Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a anamanian breeding program, **Aquaculture**, v. 368, p. 36-39, 2012. doi: 10.1016/j.aquaculture

DE FRANCISCO, A. K.; GALETTI-JR, P. M. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. **Genetics and Molecular Biology**. v. 28, n. 2, p. 258-261, 2005.

DRAZEN, J. M.; YANDAVA, C. N.; DUBE, L.; SZCZERBACK, N.; HIPPENSTEEL, R.; PILLARI, A.; ISRAEL. E.; SCHORK, N.; SILVERMAN, E. S.; KATZ, D. A.; DRAJESK, J. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. **Nature Genetics**, v. 22, p. 168-170, 1999.

ENCOMIO, V. G.; CHU, F. L. E. Seasonal variation of Heat Shock Protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). **Journal of Shellfish Research**, v. 24, p. 167–175, 2005.

ESCOBEDO-BONILLA C. M.; ALDAY-SANZ V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.

FABBRI, E.; VALBONESI, P.; FRANZELLITTI, S. HSP expression in bivalves. **Invertebrate Survival Journal**, v. 5, p. 135–161, 2008.

FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. **El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura**. Roma, 2012.

FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. **Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012**. Roma, 2014.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.

FEIJÓ, R. G.; KAMIMURA, M. T.; OLIVEIRA-NETO, J. M.; VILA-NOVA, C. M.; GOMES, A.; COELHO, M. D. G. L.; VASCONCELOS, R. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARINS, L. F.; MAGGIONI, R. 2013. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 380, p. 1-5, 2013.

FREITAS, P. D.; JESUS, C. M.; GALETTI JR, P. M. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and cross-species amplification in other penaeid species. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 324–326, 2007. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01595.x

GANAL, M. W.; ALTMANN, T.; RODER, M. S.; SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 211-217, 2009.

GARCIA, D.; ALCIVAR-WARREN, A. characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 4, p. 1203–1216, 2007.

GITTERLE, T.; SALTE, R.; GJERDE, B.; COCK, J.; JOHANSEN, H.; SALAZAR, M.; LOZANO, C.; RY, M. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. **Aquaculture**, v. 246, p. 139– 149, 2005.

GONÇALVES, M. M. Mapeamento genético no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de São Carlos, 70 f, 2009.

GLENN, K. L.; GRAPES, L. ; SUWANASOPEE, T.; HARRIS, D. L.; LI, Y.; WILSON, K.; ROTHSCILD, M. F. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. **Animal Genetics**, v. 36, p. 235–236, 2005. doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01274.x.

GRIFFIN, T. J.; SMITH, L. M., Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 77-84, 2000.

GUERRELHAS, A. C. B.; TEIXEIRA, A. P. G. Panorama da situação da mancha branca no Nordeste. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, RJ: SRG Gráfica e Editora Ltda, v. 22, n. 129, p. 38-41, jan./fev. 2012.

GITTERLE, T.; SALTE, R.; GJERDE, B.; COCK, J.; JOHANSEN, H.; SALAZAR, M.; LOZANO, C.; RY, M. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. **Aquaculture**, v. 246, p. 139– 149, 2005.

GITTERLE, G. T.; ØDEGARD, J.; GJERDE, B.; RYE, M.; SALTE, R. Genetic parameters and accuracy of selection for resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* using different statistical models. **Aquaculture**, v. 251, p. 210– 218, 2006.

GUPTA, P. K.; ROY, J. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v. 80, n. 4, p. 4524-535, 2001.

HARPENI, E. The potential roles of interferon in managing viral diseases in crustacean. **Journal of Coastal Development**, v. 14, n. 2, p. 91-103, 2011.

HAUTON, C. The scope of the crustacean immune system for disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 251-260, 2012.

HENNING, O.; ARCE, S. M.; MOOS, S. M.; PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Development of a specific pathogen free population of the Chinese fleshy prawn, *Fenneropenaeus chinensis* Part II. Secondary quarantine. **Aquaculture**, v. 250, p. 579-585, 2005.

HUANG, Y.; YIN, Z.; WENG, S.; HE, J.; LI, S. Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v. 364-365, p. 111-117, 2012.

KHADIJAH, S.; NEO, S. Y.; HOSSAIN, M. S.; MILLER, L. D.; MATHAVAN, S.; KWANG, J. Identification of White Spot Syndrome Virus Latency-Related Genes in Specific- Pathogen-Free Shrimps by Use of a Microarray. **Journal of Virology**. v. 77, p. 10162-10167, 2003.

KRAWIEZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D.N.; The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Human Genetics**, v. 90, p. 41-54, 1992.

LABREUCHE, Y.; WARR, G. W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 1002-1010, 2013.

LAI, E.; RILEY, J.; PURVIS, I.; ROSES, A. A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE. **Genomics** , v. 54, n. 1, p. 31-38, 1998.

LEU, J. H.; LIN, S. J.; HUANG, J. Y.; CHEN, T. C.; LO, C. F. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p.1011-1017, 2013.

LIAO, P.; LEE, K. H.; From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p.149-158, 2010.

LIGHTNER, D. V.; POULOS, B. T.; TANG, K. F.; PANTOJA, C. R.; NUNAN, L. M.; NAVARRO, S. A. Application of molecular diagnostic methods to penaeid shrimp diseases: advances of the past 10 years for control of viral diseases in farmed shrimp. **Developments in Biologicals**, v. 126, p. 117-122, 2006.

LIGHTNER, D. V. Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *Em: Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, p. 121-134, 2011.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; PANTOJA, C. R.; TANG, K. F. J.; NOBLE, B. L.; SCHOFIELD, P.; MOHNEY, L. L.; NUNAN, L. M.; NAVARRO, S. A. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174-183, 2012.

LIMA, A. P. S.; SANTOS, A. C. L.; DANTAS, H. L.; GOMES-FILHO, M. A.; MAGGIONI, R.; COIMBRA, M. R. M. Genetic monitoring of broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in a closed rearing system in Pernambuco, Brazil. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1461-1466, 2008. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02022.x

LIMA, A. P. S.; SILVA, S. M. B. C.; OLIVEIRA, K. K. C.; MAGGIONI, R.; COIMBRA, M. R. M. Genetics of two marine shrimp hatcheries of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 325-331, 2010.

LUVESUTO, E.; FREITAS, P. D.; GALETTI JUNIOR, P. M. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1156-1160, 2007.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. A Real-Time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**. v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MADRID, R. M. 2005. Análises das exportações da Carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: Cinco anos de sucesso e, 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**. Recife, v. 7, n. 1, p. 76-84.

MAGGIONI R. M.; COIMBRA, M. R. M.; COSTA, R. B.; DINIZ, F. M.; MOLINA, W. F.; OLIVEIRA, D. M.; PUCHNICK-LEGAT, A. Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p.968-974, 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800023

MARTIN-MARTI S.; ONTERU, S.K.; DU, Z. Q.; ROTHSCCHILD, M. F. SNP analyses of the 5HT1R and STAT genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 1, p. 53-55, 2010.

MELLO, C. C.; DELSOL, G. Y. L.; MOTTE, E.; ESCOBAR, V. A. C.; REY, P. F.; MARTINS, M. L.; ARANA, L. A. V.; MELLO, G. L. Selection of shrimp breeders free of white spot syndrome and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 531-537, 2011.

MORRIS, J. P.; THATJE, S.; HAUTON, C. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. **Molecular Ecology**. v. 22, p. 1494–1502, 2013.

MOSS, S. M; STEVE M.; ARCE, S. M.; MOSS, A. D. SPF Defined: Pathogen-Free Status of Shrimp Limited. **Global Aquaculture Advocate**, p. 86-87, 2003.

MOSS, S. H.; MOSS, D. S.; ARCE, S. M.; LIGHTNER, D. V.; LOTZ, J. M. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 247–250, 2012.

NAKANO, H.; KOUBI, H.; UMEZAWA, S. Mass mortalities of cultured karuma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trails. **Fish Pathology**, v. 29, p. 135-139, 1994.

NARUM, S. R.; BANKS, M.; BEACHAM, T. D.; BELLINGER, M. R.; CAMPBELL, M. R.; DEKONING, J.; ELZ, A.; GUTHRIE III, C. M.; KOZFKAY, C.; MILLER, K. M.; MORAN, P.; PHILLIPS, R.; SEEB, L. W.; SMITH, C. T.; WARHEIT, K.; YOUNG, S. F.; GARZA, J. C. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 15, p. 3464-3477, 2008.

NEI, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publishing Company,

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. White Spot Disease in Brazil. **Disease Information**, v. 18, n. 3, p. 23-30, 2005.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Diagnostic manual for aquatic animal diseases**. Paris: OIE, 2006.

ORAGUZIE, N. C.; RIKKERINK E. H. A.; GARDINER S. E.; SILVA, H. N. **Association Mapping in Plants**. New York, USA: Springer, v. IX, p. 277, 2007.

OTOSHI, C. A.; ARCE, S. M.; MOSS, S. M. Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. **Aquacultural Engineering** v. 29, p. 93–107, 2003.

PAN, D.; HE, N.; YANG, Z.; LIU, H.; XU, X. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 29, p. 103-112, 2005.

PANTOJA, C. R.; SONG, X.; XIA, L.; GONG, H.; WILKENFELD, J.; NOBLE, B.; LIGHTNER, D. V. Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis*: Part 1: Disease Pre-screening and Primary Quarantine. **Aquaculture**. v. 250, n. 3, p. 573-578, 2005.

PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D.; BARRACO, M.A. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. *Em*: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. (Org.) **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. ABRAPOA, Maringá, 1º edição, 2012.

PÉREZ, F. ERAZO, C.; ZHINAULA, M.; VOLCKAERT, F.; CALDERÓN, J. A sex-specific linkage map of the White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. **Aquaculture**, v. 242, p. 105-118, 2004.

PEREZ-ENRIQUEZ R.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, F.; CRUZ, P. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. **Aquaculture**, v. 297, p. 44-50, 2009.

PORTE, C.; BIOSCA, X.; SOLE, M.; ALBAIGÉS J. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). **Environmental pollution**, v. 112, p. 261-268, 2001.

PRUDER, G. D. Biosecurity: application in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v. 32, n. 1, p. 3-10, 2004.

QIAN, Z.; LIU, X.; WANG, L.; WANG, X.; LI, Y.; XIANG, J.; WANG, P. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 211-220, 2012.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha: Desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, v. 7, n. 2, p. 38-44, 2005.

SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; SOUZA, R. V.; COSTA, S. W.; GUZENSKI, J. Síntese Informativa da Maricultura. Mariculture Newsletter of EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina SA), p. 2, 2012.

SCHLOTTERER C.; The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p.63-69, 2004.

SEIFFERT W. Q.; BELTRAME E.; ANDREATTA E. R.; MAGIONNI D. S. Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aqüicultura**, v. 16, p. 32-38; 2006.

SHEN, X.; REN, J.; CUI, Z.; SHA, Z.; WANG, B.; XIANG, J.; LIU, B. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Penaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. **Gene**, v. 403, n. 1/2, p. 98-109, 2007.

SONG, L.; WANG, L.; QIU, L.; ZHANG, H. Bivalve immunity. *In*: SÖDERHÄLL, K. **Invertebrate Immunity**. Springer US, p. 44-65, 2010.

SRIVASTAV, P. Roles of heat – shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v. 2, n. 3, p. 185-194, 2002.

STENTIFORD, G. D.; NEIL, D. M.; PEELER, E. J.; SHIELDS, J. D.; SMALL, H. J.; FLEGEL, T. W.; VLAK, J. M.; JONES, B.; MORADO, F.; MOSS, S.; LOTZ, J.; BARTHOLOMAY, L.; BEHRINGER, D.C.; HAUTON, C.; LIGHTNER, D. V. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 141-157, 2012.

TAMAYO, R. J. M. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bone, 1931) introduced to Cuba. **Master thesis** – International Fisheries Management Department of Aquatic Biosciences, Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø, Norway. 42p. 2006.

THANH, N. M.; BARNES, A. C.; MATHER, P. B.; LI, Y.; LYONS, R. E. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 301, p. 7–15, 2010.

WANG, L.; ZHI, B.; WU, W.; ZHANG, X. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 706-71, 2008.

WRIGHT, S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, v. 31, p. 39-59.

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420.

WU, R.; SUN, Y.; LEI, L. M.; XIE, S. T. Molecular Identification and Expression of Heat Shock Cognate 70 (*HSC70*) in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 234–242, 2008.

YU, M; CHENG, Y.; ROTHSCILD, M. F. SNP analysis of Molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp. **Archiv fur Tierzucht**, v. 49, n. 4, p.411-412, 2006.

VIEIRA-GIRÃO, P. R. N.; ROCHA, I. R. C. B.; COSTA, F. H. F.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Differential induction of HSP-70 expression in response to IHHNV in white shrimp *Litopenaeus vannamei* naturally co-infected with IHHNV and IMNV. **International Aquatic Research**, v. 4, n.1, p. 1-13, 2012. doi:10.1186/2008-6970-4-17

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-306, 2002.

VELA-AVITÚA, S.; MONTALDO, H.H.; MÁRQUEZ-VALDELAMAR, L.; CAMPOS-MONTES, G.R.; CASTILLO-JUÁREZ, H. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, 2013. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-11>

ZENG, D.; CHEN, X.; LI, Y.; PENG, M.; MA, N.; JIANG, W.; YANG, C.; LI, M. Analysis of HSP70 in *Litopenaeus vannamei* and detection of snps. **Journal of Crustacean Biology**, v. 28, n. 4, p. 727-730, 2008.

ZHANG, L. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. **Genetica**, v. 131, p. 37-49, 2007.

ZHOU, J.; WANG, L.; XIN, Y.; WANG, W. N.; HE, W. Y.; WANG, A. L.; LIU, Y. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* **Journal of Thermal Biology**, v. 35, n. 6, p. 284-289, 2010a.

ZHOU, J.; WANG, W. N.; HE, W. Y.; ZHENG, Y.; WANG, L.; XIN, Y.; LIU, Y.; WANG, A. L. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 3, p. 170-178, 2010b.